

University of Groningen

Between adaptation and virulence

Palma Medina, Laura Marcela

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2019

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Palma Medina, L. M. (2019). *Between adaptation and virulence: A proteomics view on Staphylococcus aureus infections*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Chapter 7

Nederlandse samenvatting

Staphylococcus aureus is een bacterie die regelmatig aangetroffen wordt in het microbioom van de mens. Hoewel *S. aureus* zich overwegend als een onschuldige commensaal gedraagt kan hij zich ook manifesteren als een invasieve ziekteverwekker die een desastreus effect heeft op de gezondheid van zijn gastheer. Infecties veroorzaakt door *S. aureus* kunnen zich vrijwel overal op en in ons lichaam voordoen. Zo kunnen niet alleen de huid, zachte weefsels en onze botten door deze bacterie aangetast worden, maar ook belangrijke organen zoals het hart, de nieren en de longen. *S. aureus* is met name een beruchte veroorzaker van luchtweginfecties die kunnen escaleren tot een zogenaamde necrotiserende pneumonie die veelal fataal is voor de getroffen patiënt. Vanwege deze klinische relevantie wordt *S. aureus* al sinds vele jaren bestudeerd. Desondanks is onderzoek naar deze gevaarlijke ziekteverwekker nog steeds nodig, met name omdat hij snel resistent wordt tegen antibiotica, zich gemakkelijk aanpast aan nieuwe omstandigheden en omdat hij zich op veel plekken in ons lichaam kan verstoppen. Zo is er nog erg veel onduidelijkheid over de specifieke adaptaties die *S. aureus* in staat stellen het menselijke lichaam te koloniseren, te infecteren en zich aansluitend zelfs te verbergen binnen in onze eigen cellen. Om dergelijke aanpassingen beter te kunnen begrijpen werd bij het onderhavige promotie-onderzoek gebruik gemaakt van infectiemodellen, waarbij de condities in ons lichaam zo nauwgetrouw mogelijk werden nagebootst in een experimentele setting. Hierbij werd de aandacht met name gelegd op infectie van het long-epitheel. De aanpassingen die *S. aureus* onder dergelijke infectie-simulerende condities laat zien werden bestudeerd met behulp van geavanceerde proteomics-technieken. Daarnaast werd gebruik gemaakt van *S. aureus* stammen die geïsoleerd zijn op verschillende geografische locaties en die een voorkeur vertonen voor het veroorzaken van infecties in zwakke patiënten in een ziekenhuis of in gezonde individuen. Hiermee werd recht gedaan aan de

genetische diversiteit en het uiteenlopende epidemiologische gedrag van de bacteriesoort *S. aureus*.

In **hoofdstuk 1** van dit proefschrift wordt het onderhavige onderzoek geïntroduceerd met een overzicht van de mechanismen die *S. aureus* inzet om zich aan te passen aan veranderende omstandigheden binnen en buiten het menselijke lichaam. Dit gebeurt niet alleen door regulatie van de gen-expressie, maar ook door het verwerven van 'nieuwe' genen die bijvoorbeeld coderen voor antibioticumresistentie of voor zogenaamde virulentiefactoren. Deze virulentiefactoren zijn veelal eiwitten, waarvan de bacterie gebruik maakt om onze weefsels en cellen te koloniseren, binnen te dringen en te corrumperen, of om ons afweersysteem te ontwijken en uit te schakelen. In hoofdstuk 1 worden tevens de verschillen tussen de *S. aureus* varianten die in ziekenhuizen gevonden worden, ook bekend als 'hospital-associated' ofwel 'HA-*S. aureus*', en de varianten die overwegend bij gezonde personen ziekte veroorzaken en die bekend staan als 'community-associated' ofwel 'CA-*S. aureus*' uiteengezet.

Het onderzoek beschreven in **hoofdstuk 2** werd uitgevoerd om beter te begrijpen welke aanpassingen *S. aureus* ondergaat gedurende het verblijf van deze bacterie in het binnenste van onze cellen, met name het long-epitheel. Hiertoe werden gedurende een periode van vier dagen de proteomen van de gastheercellen en de binnengedrongen ziekteverwekkers simultaan bestudeerd. Dit bracht een sterke wisselwerking tussen de bacteriën en de gastheercellen aan het licht. Opvallend was dat in de longepitheelcellen twee *S. aureus* subpopulaties aangetoond konden worden. Enerzijds was er een snel groeiende subpopulatie gedurende de eerste 24 uur na de start van de infectie detecteerbaar. Deze populatie was prominent aanwezig, maar bleef geëncapsuleerd in membraanvesicles van de gastheercellen. Uiteindelijk veroorzaakte deze subpopulatie van de bacteriën lysis van de gastheercel. De proteoomanalyses lieten duidelijk zien, dat de gastheercel-lysis het

gevolg was van een apoptotische reactie die getriggered werd door de intracellulaire ziekteverwekker. De andere sub-populatie van geïnternaliseerde *S. aureus* bacteriën verkeerde in een soort slaapstand en bevond zich voornamelijk in het cytoplasma van de gastheercellen. Vier dagen na aanvang van de infectie viel de aanwezigheid van deze slapende *S. aureus* subpopulatie samen met de expressie van ontstekings-gerelateerde gastheereiwitten. Een belangrijke conclusie die uit dit onderzoek getrokken kan worden is dat de gastheer en de geïnternaliseerde ziekteverwekker continu hun metabolisme aanpassen aan de klaarblijkelijk veranderende omstandigheden binnen in de gastheer cel. De richting waarin deze aanpassingen plaatsvinden is bepalend voor de uitkomst van de infectie. *S. aureus* bleek vooral de expressie van eiwitten aan te passen die nodig zijn om te overleven in milieus waar voedsel en zuurstof in beperkte mate aanwezig zijn. De lage zuurstofspanning in de gastheercellen was bijvoorbeeld aanleiding voor de bacterie om vooral eiwitten aan te maken die nodig zijn voor fermentatieve groei. Andere significante aanpassingen betroffen het centrale koolstofmetabolisme, waarbij een toename van eiwitten betrokken bij de citroenzuurcyclus en aminozuurafbraak waargenomen werd. Deze aanpassingen reflecteren de inspanningen van *S. aureus* om energie te genereren uit alternatieve koolstof- en stikstof-bronnen. Daarnaast zal het vermoede verbruik van aminozuren van invloed zijn op het metabolisme van de gastheer cel, met name de biosynthetische routes voor arginine en asparagine (1). Het onderzoek beschreven in hoofdstuk 2 laat echter ook zien dat het metabolisme voor andere aminozuren, met name proline, glutamaat en alanine ook een rol kan spelen tijdens intracellulaire infectie. Alles tezamen beschouwd maken de beschreven experimenten een dynamische metabole wisselwerking tussen bacterie- en gastheercellen zichtbaar. De gastheercellen die de infectie overleven dragen een niet-replicerende populatie van persistente *S. aureus* bacteriën in hun cytoplasma. Deze waarnemingen laten duidelijk zien, dat de uiteindelijke uitkomst van een

intracellulaire *S. aureus* infectie niet alleen bepaald wordt door de productie van virulentiefactoren, maar ook door de manier waarop intracellulair aanwezige nutriënten benut en uitgeput worden. De uitputting van nutriënten geeft vervolgens weer aanleiding tot verdere metabole adaptaties bij zowel de gastheer als de intracellulaire bacteriën.

De analyses beschreven in hoofdstuk 2 houden geen rekening met de mogelijke variaties die zich kunnen voordoen in geval van andere aandoeningen voorafgaand aan de infectie. Daarom werd het longepitheel-infectiemodel zodanig aangepast, dat het twee regeneratieve stadia van beschadigd longepitheel simuleert, te weten het initiële stadium van celmigratie en herstel van de barrière en het vervolgstadium waarbij fibrogenese optreedt. De resultaten die op grond van deze aanpassingen in het infectiemodel verkregen werden zijn beschreven in **hoofdstuk 3**. Ze laten zien, dat de initiële stadia van barrièreherstel bepalend zijn voor het verdere verloop van de infectie. Het geringe polarisatieniveau van het longepitheel tijdens de fase van epitheelcelmigratie gaf aanleiding tot internalisatie van grotere aantallen bacteriën en snelle replicatie van de geïnternaliseerde bacteriën, hetgeen de overlevingskansen van de geïnfecteerde gastheercellen aanzienlijk verlaagde. In het stadium van fibrinogese was de internalisatie van bacteriën veel geringer wat te verklaren is door de vorming van een 'zonula occludens' (zogenaamde 'tight junctions' in het Engels), waarbij de membranen van de longepitheelcellen samenkomen en een barrière vormen. Ongeacht de verschillen in de twee infectie-scenario's, bleken de aanpassingen in het proteoom van de bacteriën na internalisatie grotendeels overeen te komen. De belangrijkste verschillen werden waargenomen voor eiwitten die deel uit maken van het zogenaamde Rex-regulon. Rex is een sensor die veranderingen in de interne redoxpotentiaal van de bacterie meet die veroorzaakt kunnen worden door veranderingen in de zuurstofspanning, activatie van de citroenzuurcyclus of een verhoogde concentratie van stikstofmonoxide (NO). Nader onderzoek liet zien dat

de NO-niveaus inderdaad verschilden in de beide infectie-scenarios en dat dit het gevolg was van overproductie van de NO-synthase van *S. aureus*. Dit fenotype is reeds eerder als kenmerk van *S. aureus* beschreven tijdens de kolonisatie van gastheerweefsels (2). Deze waarnemingen impliceren dat *S. aureus* de redox-staat van zijn cytoplasma moduleert met behulp van NO om de homeostase te garanderen voorafgaand aan internalisatie door gastheercellen. Tezamen verschaffen de resultaten beschreven in hoofdstuk 3 een beter inzicht in de manier waarop *S. aureus* op slinkse wijze misbruik maakt van beschadigd longepitheel en hoe de geïnfecteerde epitheelcellen slechts weinig adequaat hierop kunnen reageren.

Om een dieper inzicht te krijgen in het vermogen van *S. aureus* om zich aan te passen aan andere milieus werd het onderzoek beschreven in de laatste twee experimentele hoofdstukken van dit proefschrift gewijd aan meticilline-resistente *S. aureus* (MRSA) isolaten met een verschillende epidemiologische achtergrond.

Hoofdstuk 4 beschrijft de genoom- en proteoomanalyse van zes CA- en zes HA-MRSA-isolaten die behoren tot de *S. aureus* USA300 lijn en allemaal van patiënten in Denemarken (DK) afkomstig zijn. Tevens werden drie *S. aureus* HA-isolates uit het Nederlands-Duitse grensgebied (NL-DE) als controle in het onderzoek meegenomen. Bij vergelijking van het kerngenoom van al deze isolaten vertoonden de CA^{DK}-isolaten meer gelijkenis met de HA^{NL-DE}-isolaten, terwijl het variabele gedeelte van het genoom meer overeenkomsten tussen de HA^{DK}- en de HA^{NL-DE}-isolaten liet zien. Bij de analyse van het exoproteoom bleek, dat de meeste uitgescheiden eiwitten van de drie groepen overeenkwamen. Er werden desalniettemin heel duidelijke verschillen waargenomen in de hoeveelheden van deze uitgescheiden eiwitten en er bleken ook groep-specifieke eiwitten te zijn. Een opmerkelijke bevinding was dat de meeste uitgescheiden eiwitten op grond van hun eigenschappen en bekende functie eigenlijk in het cytoplasma van de bacteriën gelokaliseerd zouden moeten zijn en niet in het extracellulaire milieu.

Dergelijke eiwitten worden tegenwoordig vaak extracellulaire cytoplasmatische eiwitten of ECPs genoemd (3). Waarschijnlijk heeft een aantal van deze eiwitten een zogenaamde ‘moonlighting’ functie. Dit wil zeggen dat ECPs naast hun bekende en goed-gekaracteriseerde functie in het cytoplasma nog een tweede functie buiten de bacteriecel vervullen, bijvoorbeeld in de kolonisatie en infectie van de gastheer. Dergelijke eiwitten werden in grotere hoeveelheden door de CA-isolaten in de exponentiële groeifase uitgescheiden, terwijl dit voor de HA-isolaten het geval was tijdens de stationaire groeifase. Dit verschil duidt er op, dat er een verschil in de timing van ECP secretie is in de CA- en HA-isolaten. Tenslotte liet een vergelijking van de exoproteoom-abundantie-signaturen zien dat, onafhankelijk van de geografische oorsprong van de onderzochte isolaten, de twee groepen van HA-isolaten een cluster vormen die verschilt van het cluster dat gevormd wordt door de CA-isolaten. Deze verschillen werden weerspiegeld in de resultaten van een experiment, waarbij de internalisatie van de diverse isolaten in longepitheelcellen werd onderzocht. In dit geval vertoonden de CA-isolaten intracellulaire groei, terwijl de HA-isolaten dit niet deden. Deze bevindingen suggereren dat de ECPs mogelijk bepalend zijn voor het verschil in de epidemiologie van de onderzochte isolaten en hun intracellulaire groei en overleving. ECPs waren al eerder geassocieerd met de virulentie van MRSA-isolaten, maar een mogelijke rol van ECPs in de epidemiologie van MRSA is een compleet nieuwe bevinding. De resultaten beschreven in hoofdstuk 4 laten verder zien, dat proteoomanalyses een geschikt hulpmiddel kunnen vormen bij de karakterisatie van *S. aureus* isolaten en het voorspellen van hun epidemiologische gedrag.

In hoofdstuk 2 werd reeds geconcludeerd dat metabole aanpassingen een sturende rol kunnen hebben in het vermogen van *S. aureus* om ziekte te veroorzaken. **Hoofdstuk 5** beschrijft een uitgebreide analyse van een subset van de klinische HA- en CA-MRSA isolaten uit Denemarken die in hoofdstuk 4

geïntroduceerd zijn. Het cellulaire proteoom van deze isolaten liet, net als het exoproteoom, aanzienlijke verschillen zien die specifiek waren voor de HA- en CA-MRSA-isolaten. In de CA-MRSA-groep werden hogere hoeveelheden aangetroffen van eiwitten die betrokken zijn bij de citroenzuurcyclus, het aminozuurmetabolisme en de gluconeogenese. De voorprogrammering van de CA-isolaten voor gebruik van deze metabole routes suggereert, dat ze ingesteld zijn op voedselarme milieus. Dit is in overeenstemming met het gegeven, dat deze isolaten veelal betrokken zijn bij infecties van de huid en zachte weefsels die relatief voedselarm zijn. Omgekeerd werden in de HA-isolaten grotere hoeveelheden van eiwitten gevonden die een rol spelen bij de glycolyse en de pentosefosfaatroute en lagere hoeveelheden van eiwitten die betrokken zijn bij de biosynthese van purines. Dit suggereert dat de HA-isolaten een voorkeur hebben voor voedselrijke niches, zoals ons bloed. Tezamen ondersteunen deze waarnemingen het idee, dat aanpassingen in het centrale koolstofmetabolisme de onderzochte MRSA-isolaten optimaal geschikt maken voor het veroorzaken van infecties in zwakke patiënten in een ziekenhuisomgeving of in de gemeenschap van gezonde individuen.

Alle resultaten beschreven in dit proefschrift tezamen onderstrepen het idee, dat het metabolisme een sleutelrol speelt bij de virulentie van de *S. aureus* bacterie. Tot dusver werd de rol van metabole routes eigenlijk stelselmatig onderschat in infectie-gerelateerd onderzoek, maar op grond van de onderhavige studies moet geconcludeerd worden, dat ze eigenlijk een sleutelrol spelen bij het vermogen van *S. aureus* om te groeien en te overleven in de verschillende niches van het menselijke lichaam. Tevens kan geconcludeerd worden, dat proteomics een waardevolle benadering is om de aanpassingen van *S. aureus* en zijn humane gastheer onder infectie-condities in kaart te brengen en om onze kennis over de verschillen tussen CA- en HA-MRSA-isolaten te verdiepen. De hier beschreven karakterisering van CA- en HA-MRSA-isolaten op proteoom-niveau was

gebaseerd op cultures in het zogenaamde RPMI medium, dat de condities nabootst die *S. aureus* ondervindt gedurende bloedbaaninfecties (4). In deze setting ontbreken echter de humane gastheercellen en het is daarom van belang om in toekomstige studies de MRSA-isolaten met verschillende epidemiologische achtergrond verder te karakteriseren door gebruik te maken van infectiemodellen die de condities van een echte infectie in de mens nog realistischer weergeven. Dit zou bijvoorbeeld kunnen met behulp van het long-epitheel-infectiemodel, zoals beschreven in de hoofdstukken 2 en 3 van dit proefschrift. Het humane immuunsysteem omvat tevens meerdere celtypes en afweermechanismen, waaraan *S. aureus* moet ontsnappen, of die de bacterie moet uitschakelen gedurende het verloop van een infectie. Toekomstige studies zouden daarom ook in staat moeten zijn om een nog completere simulatie van de condities in de gastheer na te bootsen. Dit zou bijvoorbeeld gerealiseerd kunnen worden door de aanwezigheid van zowel epitheelcellen als immuuncellen in één infectiemodel. Dergelijke multi-celtype infectiemodellen zullen zeer waarschijnlijk een prominente rol spelen bij toekomstig onderzoek naar infectieziektes en ze zullen ongetwijfeld leiden tot een beter begrip van de complexe en dynamische interacties tussen de humane gastheer en commensale ziekteverwekkers zoals *S. aureus*.

Referenties

1. Ren, W., Rajendran, R., Zhao, Y., Tan, B., Wu, G., Bazer, F. W., Zhu, G., Peng, Y., Huang, X., Deng, J., and Yin, Y. (2018) Amino Acids As Mediators of Metabolic Cross Talk between Host and Pathogen. *Front. Immunol.* 9, 319
2. Kinkel, T. L., Ramos-Montañez, S., Pando, J. M., Tadeo, D. V., Strom, E. N., Libby, S. J., and Fang, F. C. (2016) An Essential Role for Bacterial Nitric Oxide Synthase in *Staphylococcus aureus* Electron Transfer and Colonisation. *Nat. Microbiol.* 2, 16224
3. Ebner, P., and Götz, F. (2019) Bacterial Excretion of Cytoplasmic Proteins (ECP): Occurrence, Mechanism, and Function. *Trends Microbiol.* 27, 176–187

4. Mäder, U., Nicolas, P., Depke, M., Pané-Farré, J., Debarbouille, M., Kooi-Pol, M. M. van der, Guérin, C., Dérozier, S., Hiron, A., Jarmer, H., Leduc, A., Michalik, S., Reilman, E., Schaffer, M., Schmidt, F., Bessières, P., Noirot, P., Hecker, M., Msadek, T., Völker, U., and Dijl, J. M. van (2016) *Staphylococcus aureus* Transcriptome Architecture: From Laboratory to Infection-Mimicking Conditions. *PLOS Genet.* 12, e1005962

